



UNITED STATES DEPARTMENT OF  
COMMERCE  
Patent and Trademark Office

Address: COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS  
Washington, D.C. 20231

SERIAL NUMBER 09/46	FILING DATE 11/30/1999 RULE -	CLASS 436 435	GROUP ART UNIT 1643 1634	ATTORNEY DOCKET NO. 07898-051001
------------------------	-------------------------------------	---------------------	--------------------------------	--

APPLICANT  
TOSHIITO, KANAGAWA, ;  
KENMAMOTO, KANAGAWA, ;  
TOSSA WATANABE, KANAGAWA, ;  
NORIURINO, KANAGAWA, ;

\*\* CONTINUED DATA \*\*\*\*\*

\*\* FOREIGN LOCATIONS \*\*\*\*\*  
JAPAN 604/1998 12/01/1998

IF REQUIRED FOREIGN FILING LICENSE  
GRANTED \*\* 1/2000

Foreign Priority claims <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	STATE OR COUNTRY -	SHEETS DRAWING 6	TOTAL CLAIMS 15	INDEPENDENT CLAIMS 4
35 USC 119 (a-d) claims met <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> Met after Allowance				
Red and Acknowledged Examiner's Signature Initials				

DRESS

JOSEPH R BAKESQ  
FISH & RICHARDSON P C  
4225 EXECUTIVE SQUARE SUITE 1400  
LA JOLLA, CA 92037

TITLE  
BIOCHIP AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME *E.g. Method for Producing Biochips*

FILING FEE RECEIVED 1228	FEE: Authority has been given in Paper No. _____ to charge/credit DEPOSIT ACCOUNT No. _____ for following:	<input type="checkbox"/> All Fees <input type="checkbox"/> 1.16 Fees ( Filing ) <input type="checkbox"/> 1.17 Fees ( Processing Ext. of time ) <input type="checkbox"/> 1.18 Fees ( Issue ) <input type="checkbox"/> Other _____ <input type="checkbox"/> Credit
--------------------------------	--	---

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JC542 U.S. PTO

09/451666



11/30/99

# 451666

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: December 1, 1998  
Application Number: Japanese Patent Application  
No. 341604/1998  
Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

November 19, 1999

Commissioner,  
Patent Office

Takahiko Kondo (seal)

Certificate No. 11-3079039

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JC542 U.S. PTO  
09/451666  
11/30/99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 8 年 1 2 月 1 日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 3 4 1 6 0 4 号

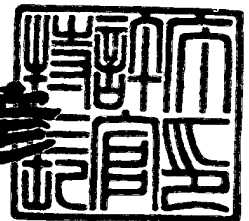
出 願 人  
Applicant (s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

1 9 9 9 年 1 1 月 1 9 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 平 1 1 - 3 0 7 9 0 3 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 10B025

【提出日】 平成10年12月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 バイオチップ及びその製造方法

【請求項の数】 7

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

    【氏名】 伊藤 敏明

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

    【氏名】 山本 顕次

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

    【氏名】 渡辺 敏正

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

    【氏名】 百合野 以子

【特許出願人】

    【識別番号】 000233055

    【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオチップ及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プレート上の複数の位置にプレートとプローブとを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けたバイオチップにおいて、前記結合剤は前記プローブが植え付けられている位置に局在していることを特徴とするバイオチップ。

【請求項 2】 プレートに該プレートとプローブを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、

プローブと結合剤とを混合した混合物をプレートに植え付けることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項 3】 プレートにプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、

プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、前記プローブと前記プレートとの結合剤を局所的に付着させるステップと、

前記結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付けるステップとを含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項 4】 請求項 2 又は 3 記載のバイオチップの製造方法において、前記プレートはガラス製であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項 5】 請求項 2～4 のいずれか 1 項記載のバイオチップの製造方法において、ピンヘッドが窪んだピンを用いてプローブを植え付けることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項 6】 プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドが窪んでいることを特徴とするピン。

【請求項 7】 プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドに十字型の溝を形成したことを特徴とするピン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、複数種類のプローブをプレートにスポットしたバイオチップに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

従来から、複数種類のDNA、RNA、たんぱく質等の生体高分子からなるプローブをガラスなどのプレートにスポットして、バイオチップを製造することが行われていた。図4は、この従来の方法の原理を説明する図である。図4(a)に示すように、複数種類のプローブDNA 1が入っているマイクロプレート2を用意する。一方、図4(b)に示すよう、プレート3としてガラス板を用意しておき、図4(c)で示すように、プレート3の表面にpoly-l-LysineをDNAとガラスの結合剤4としてコーティングする。この後、図4(d)で示すように、マイクロプレート2に入っているプローブDNA 1をピンに付着させ、表面にDNAとガラスの結合剤 (poly-l-Lysine) 4がコーティングしてあるガラスプレート3の上に、ピン5に付着させたプローブDNA 1を接触させてスポットする。マイクロプレート2に入っている全てのプローブDNAをスポットし終わるまでこの作業を繰り返し、図4(e)に示すバイオチップを製造していた。このように、従来はプレートに予めDNAとガラスの結合剤を全面コーティングし、その上にDNAをプロットしてバイオチップを製造していた。

## 【0003】

図5は、バイオチップを利用したハイブリダイゼーションの原理を説明する図である。図5(a)に示すように、プローブDNA 1が結合剤4でガラスのプレート3にスポットされているバイオチップと、蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11を、ともにハイブリダイゼーション溶液に入れてハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediamide tetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDN

Aの性質により異なる。

【0004】

このとき、サンプルDNA 11とバイチップ上のプローブDNA 1が相補鎖DNAであれば、両者は二重らせん構造をとり結合する。一方、両者が相補鎖でなければ結合せず、蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11がガラスのプレート3上にコーティングされている結合剤4と結合し、ガーベージとして残る。

【0005】

その後、図5(b)に示すように、ガラスのプレート3上に残った蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11を水12の中に入れて洗い流すと、プローブDNA 1と結合していないサンプルDNA 11は排出される。その後、図5(c)に示すように、プローブDNAと結合しているサンプルDNAに標識している蛍光物質をランプ14からの光エネルギーで励起させ、蛍光物質が励起して発光する光をCCDなどの光センサー13で検出することでハイブリダイゼーションの検出を行う。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

バイチップを用いた実験では、バイチップにサンプルDNAをふりかけ、バイチップにスポットしてあるプローブDNAとハイブリダイズさせ、どのプローブDNAとサンプルDNAが結合したかを検出している。検出の前処理として、ハイブリダイズしたあとに、結合しなかったサンプルDNAを排除するためにバイオチップを水で洗っている。しかし、プレートにDNAとガラスの結合剤を全面コーティングしているため、プローブDNAと結合しなかったサンプルDNAが必要以外の部分、すなわち、プローブDNAがスポットされていない結合剤部分に張り付き、結合剤4と結合しているサンプルDNA 11は水洗いによってもガラスのプレート3上から除去されない。それが検出時ノイズとなって現われ、感度が低くなっていた。つまり、サンプルDNAの一部がプローブDNAとの特異結合ではなく単に結合剤4に張り付いた状態でバイオチップ上にガーベージとして残り、そのサンプルDNAに標識されている蛍光物質も励起されて発光するため、ノイズとして検出され、S/Nが悪くなるという問題があった。



【0007】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みなされたもので、プレートのプローブをプロットした以外の部分にサンプルDNAが付着することのないバイオチップを提供すること、及びそのバイオチップの製造方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明では、プローブをスポットするプレート上の特定部分にだけプローブとガラスの結合剤を付着させる。すなわち、プレートにプローブをスポットした部分以外にはプローブとガラスの結合剤を付着させないため、サンプルDNAを入れてハイブリダイズさせた後、プローブと結合しなかったサンプルDNAは水で洗い流せばチップ上から無くなるため、検出時ノイズが無くなりS/Nのを向上させることができ、高感度となる。

【0009】

すなわち、本発明によるバイオチップは、プレート上の複数の位置にプレートとプローブとを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けたバイオチップにおいて、結合剤はプローブが植え付けられている位置に局在していることを特徴とする。

【0010】

本発明によるバイオチップの製造方法は、プレートに該プレートとプローブを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブと結合剤とを混合した混合物をプレートに植え付けることを特徴とする。

【0011】

本発明によるバイオチップの製造方法は、また、プレートにプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、プローブとプレートとの結合剤を局所的に付着させるステップと、結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付けるステップとを含むことを特徴とする。

プレートはガラス製とすることができる。また、ピンヘッドが窪んだピンを用いてプローブを植え付けるのが好ましい。

#### 【0012】

本発明のピンは、プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドが窪んでいることを特徴とする。

本発明のピンは、また、プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドに十字型の溝を形成したことを特徴とする。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施形態について説明する。ここでは、プローブとしてDNAを用いる場合について説明する。しかし、プローブとして用いることができるのはDNAに限られず、RNAあるいはたんぱく質をプローブとして用いることもできる。また、プレートとしてガラスプレートを用いた例で説明するが、ガラス以外にナイロン製のメンブレン等も使用可能である。

#### 【0014】

図1は、本発明の第1の実施の形態の原理を説明する図である。図1(a)に示すように、マイクロプレート2には複数種類のプローブDNA1が入っている。図1(b)に示すように、バイオチップのプレートとしてはガラスのプレート3を使用する。図1(c)に示すように、DNAとガラスとの結合剤4をマイクロプレートの各ウェルに分注し、プローブDNA1と混合する。DNAとガラスとの結合剤4としては、例えばpoly-l-Lysineあるいはカルボジイミドを用いることができる。

#### 【0015】

次に、図1(d)に示すように、結合剤4とプローブDNA1を混ぜたものをピン5で吸い上げ（もしくは溶液をピン5の先に付着させて）、プレート3にスポットする。この処理をマイクロプレート2に入っているすべてのプローブDNAに対して繰り返し行うことで、図1(e)に示すように、必要な部分にのみ結合剤4が付着し、プローブをスポットした以外の部分には結合剤4が付着してい

ないバイチップ 20 を作ることができる。

【0016】

図 2 は、本発明の第 2 の実施の形態の原理を説明する図である。図 2 (a) に示すように、マイクロプレート 2 にはプローブ DNA 1 が入っている。図 2 (b) に示すように、バイチップのプレートとしてガラスプレート 3 を使用する。図 2 (c) に示すように、結合剤 4 を例えば毛細管 6 で吸い上げ、ガラスプレート 3 上のプローブ DNA をスポットする位置に吐き出す。こうすることで、ガラスプレート 3 上のプローブ DNA 1 をスポットする位置に、予め結合剤 4 をスポットして付着させておく。その後、図 2 (d) に示すように、マイクロプレート 2 に入っているプローブ DNA 1 を結合剤 4 でフォーマットされたプレート 3 に、ピン 5 で吸い上げ（もしくはピン 5 に溶液を付着させて）繰り返しスポットする。こうして、図 2 (e) に示すように、必要な部分にのみ結合剤 4 が付着し、プローブをスポットした以外の部分には結合剤 4 が付着していないバイチップ 20 を作ることができる。

【0017】

図 6 に、本発明で用いたピン 5 のヘッド形状を示す。図 6 (a) に示したピン 5 a は、ヘッド部分、すなわちプローブを付着させる部分がアーチ型に窪んだピンである。また、図 6 (b) に示したピン 5 b は、ヘッド部分がアーチ型に窪み、さらに窪みの中に十字型に溝を切ったピンである。ピンのヘッドをアーチ状に窪ませることで、スポットするプローブの中にピンを入れたときに表面張力でうまくピンヘッドにプローブ溶液が吸い込まれるしくみになっている。アーチの深さは任意である。このピンを使うことで、ヘッドが平坦な従来のピンを用いる場合より、プレートへの DNA スポット量を約 10 倍に増やすことができる。図 6 (c) に示したピン 5 c は、平坦なヘッドの表面に十字型に溝を切ったものである。このピンによってもヘッドが単に平坦な従来のピンに比較してスポット量を増やすことができる。

【0018】

図 3 は、本発明によるバイチップを利用したハイブリダイゼーションの原理を説明した図である。図 3 (a) に示すように、プローブ DNA 1 が結合剤 4 でガ

ラスプレート 3 にスポットされているバイチップ 20 と、蛍光物質 10 で標識したサンプル DNA 11 を、ともにハイブリダイゼーション溶液に入れてハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用する DNA の性質により異なる。

## 【0019】

このとき、サンプル DNA 11 とバイチップ上のプローブ DNA 1 が相補鎖 DNA であれば、両者は二重らせん構造をとり結合する。一方、両者が相補鎖でなければ結合せず、蛍光物質 10 で標識したサンプル DNA 11 がガラスのプレート 3 上にガーベージとして残る。図 3 (b) に示すように、ガラスのプレート 3 上に残った蛍光物質 10 で標識したサンプル DNA 11 を水 12 の中に入れて洗い流すと、ガラスと DNA は結合が弱いため、ガーベージのサンプル DNA 11 が排出され、ガラスのプレート 3 上から無くなる。図 3 (c) に示すように、ハイブリダイゼーションの検出は結合しているサンプル DNA に標識している蛍光物質をランプ 14 の光で励起させ、蛍光物質が励起して発光する光を CCD 等の光センサー 13 で検出する。このとき、バイチップ 20 上にガーベージのサンプル DNA が無いため、検出の S/N 比が向上する。

## 【0020】

## 【発明の効果】

本発明によると、プローブをスポットする部分のみに結合剤を付着させたバイチップを製造することができ、バイチップ読取り時、検出感度を向上させることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明によるバイチップの製造方法の一例を説明する図。

## 【図 2】

本発明によるバイチップの製造方法の他の例を説明する図。

【図 3】

本発明のバイチップを用いたハイブリダイゼーションと検出の説明図。

【図 4】

従来のバイオチップの製造方法を説明する図。

【図 5】

従来のバイチップを用いたハイブリダイゼーションと検出の説明図。

【図 6】

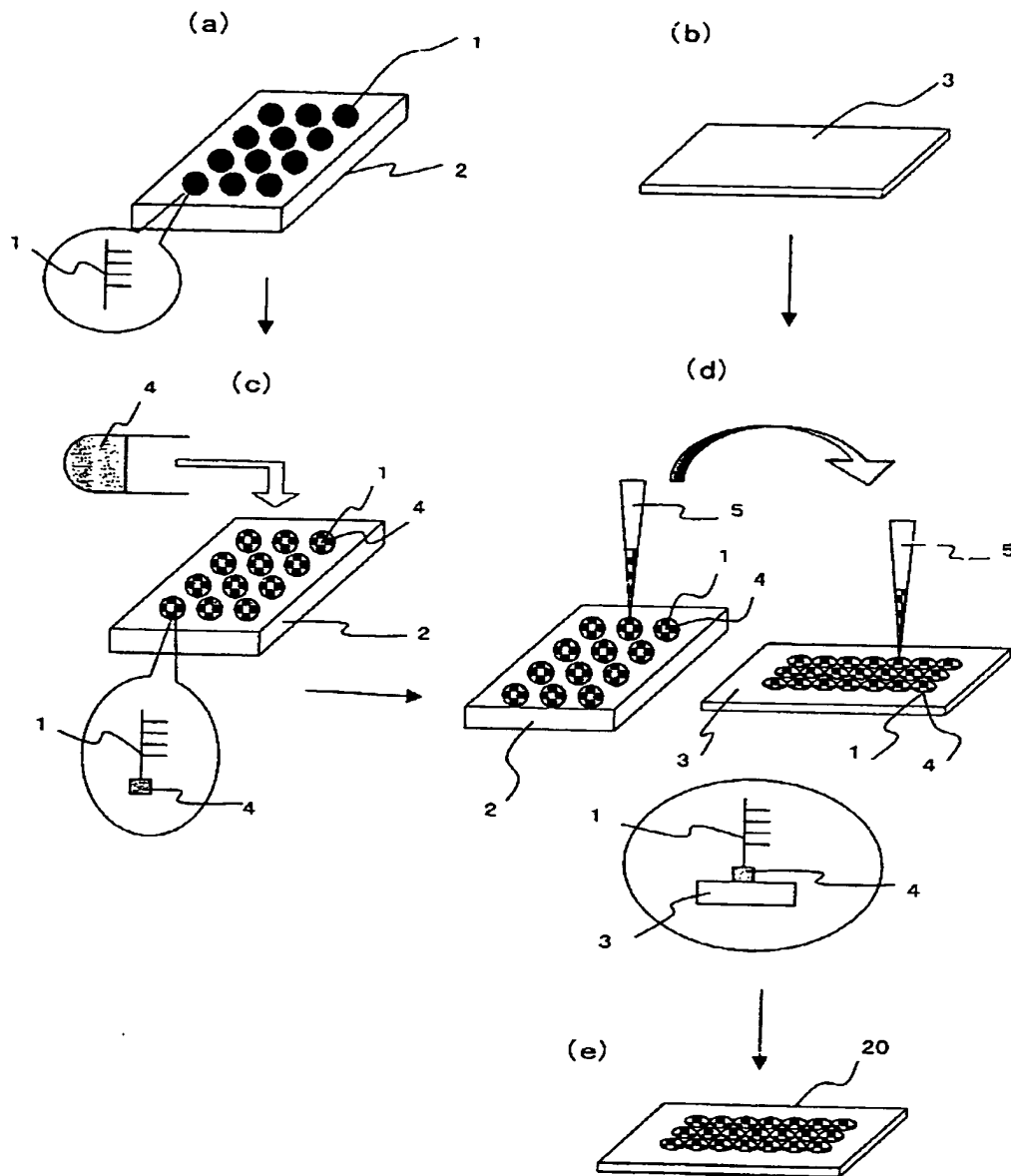
本発明によるプローブ付着用のピンの説明図。

【符号の説明】

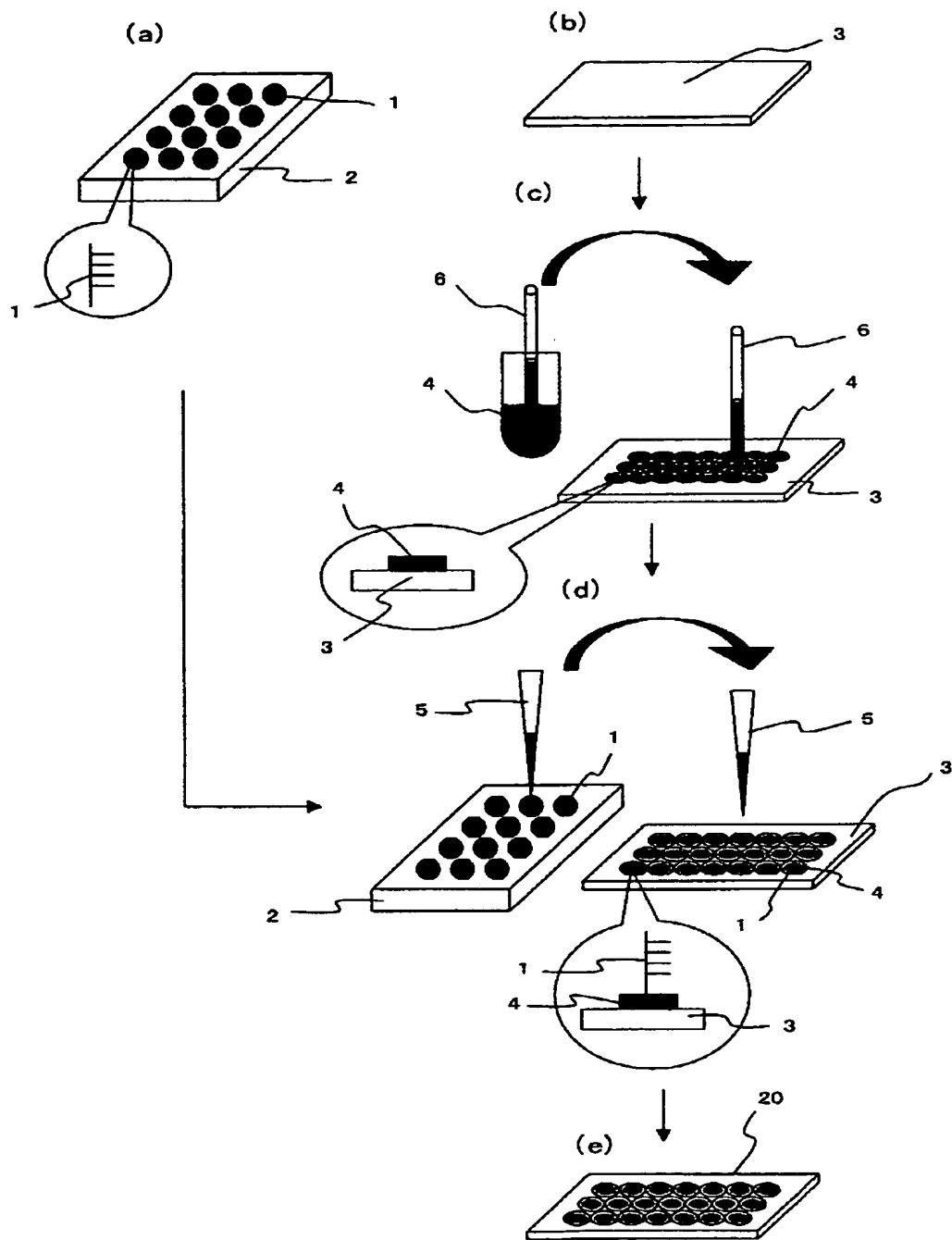
1…プローブDNA、2…プローブ格納用マイクロプレート、3…ガラスのプレート、4…結合剤、5…ピン、6…毛細管、10…蛍光物質、11…サンプルDNA、12…水、13…光センサー、14…ランプ、20…バイオチップ。

【書類名】 図面

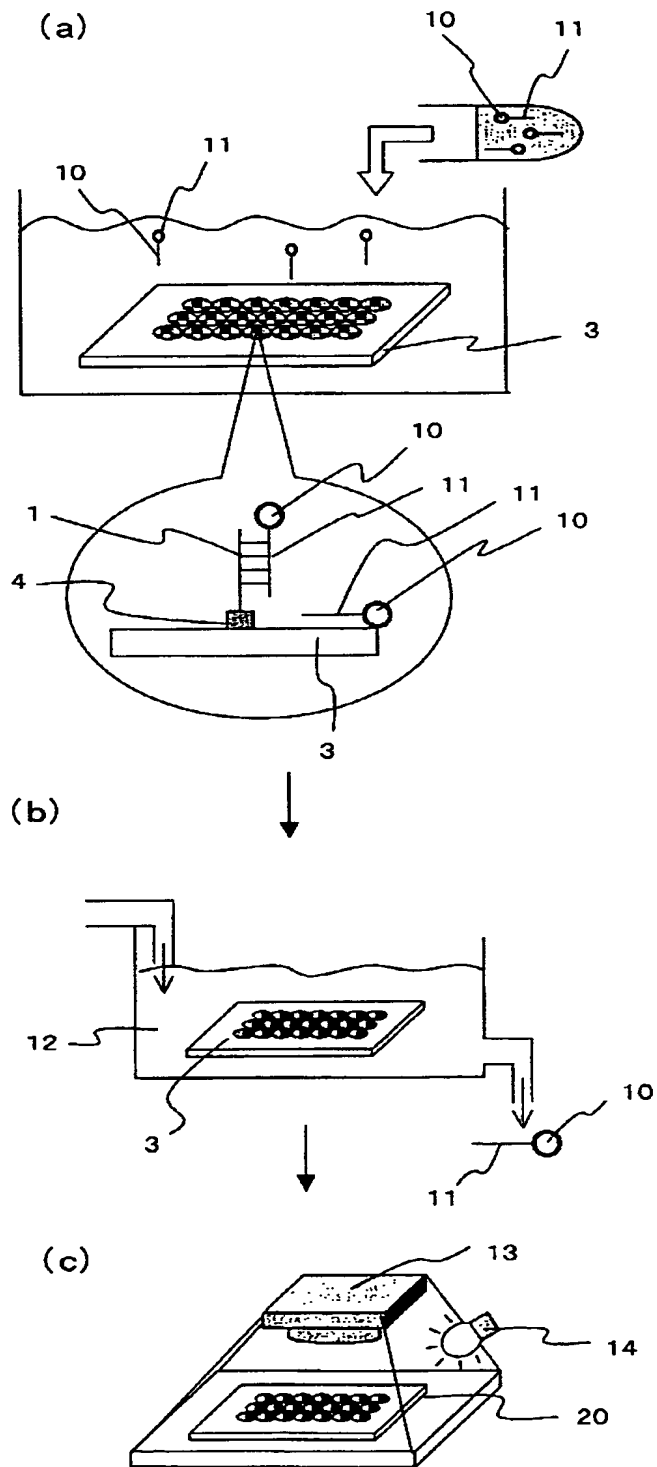
【図 1】



【図 2】

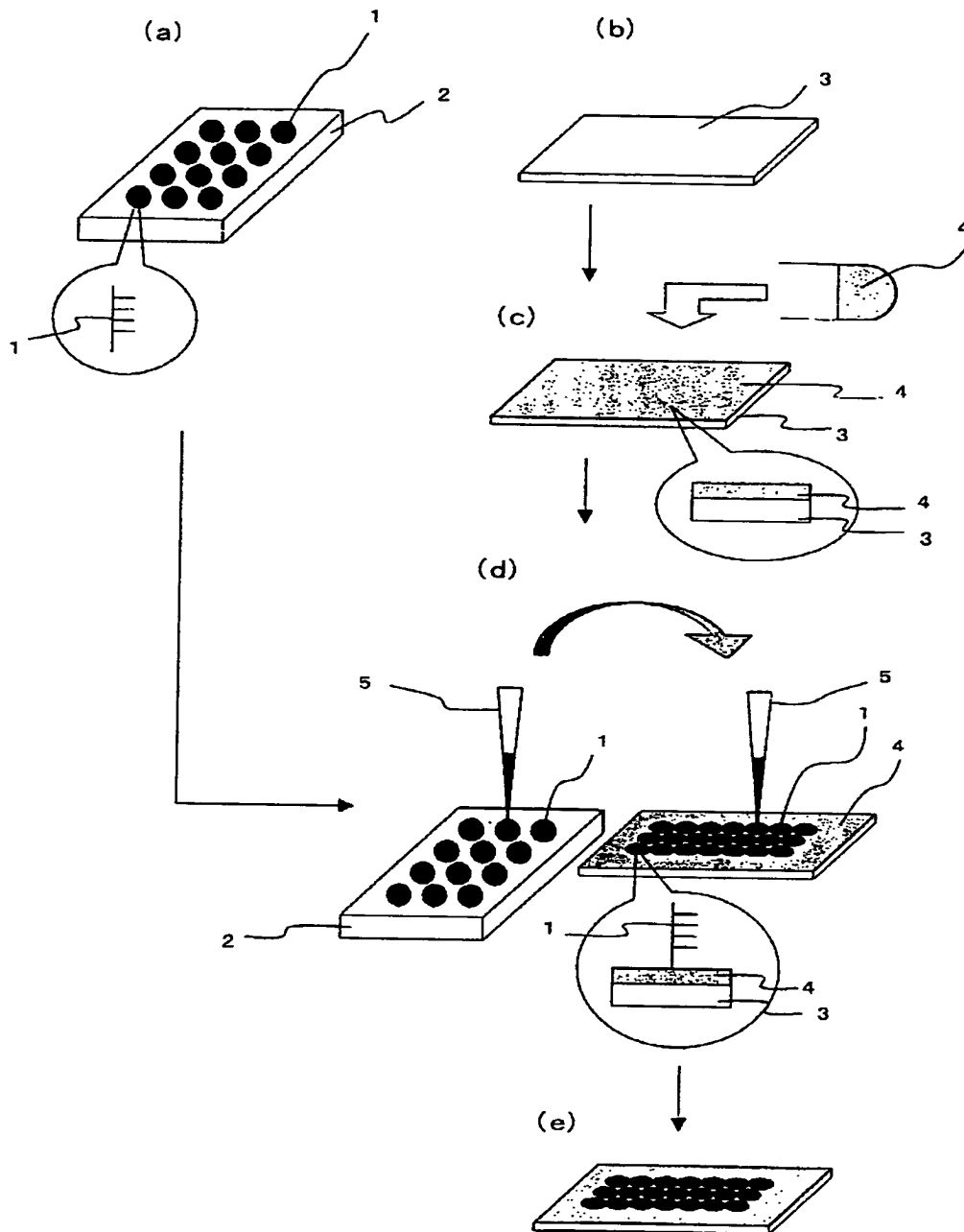


【図3】

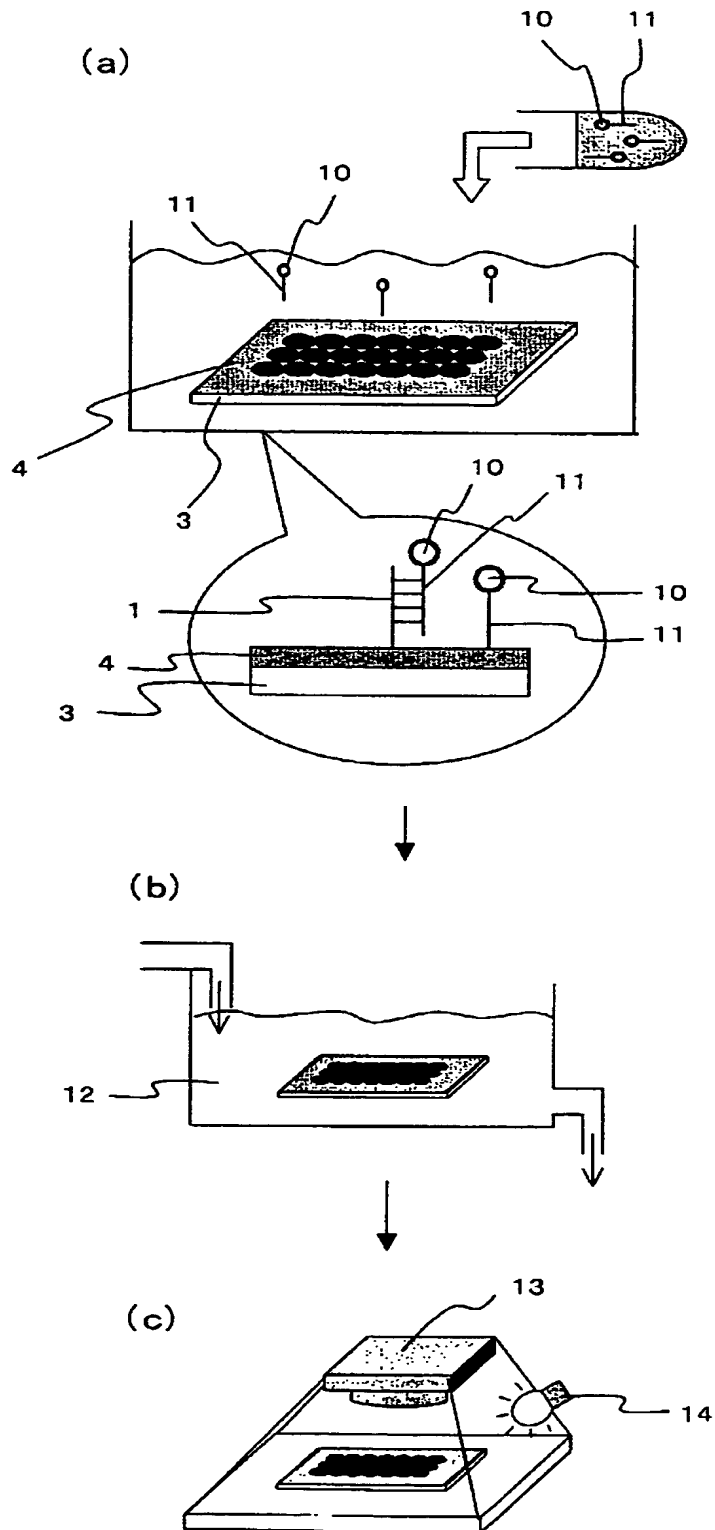




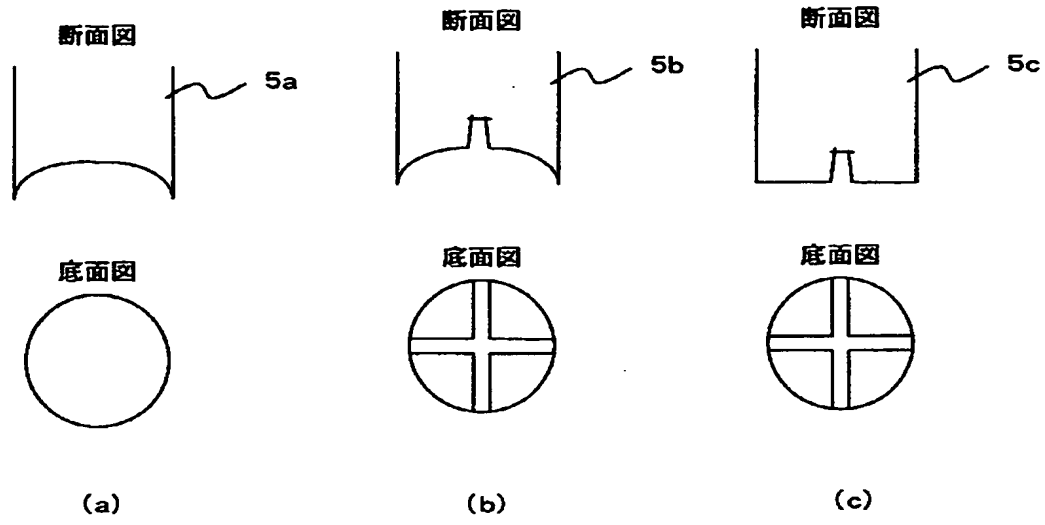
【図4】



【図 5】



【图 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プレートのプローブをプロットした以外の部分にサンプルDNAが付着することのないバイオチップを提供する。

【解決手段】 プローブ1と結合剤4とを混合した混合物をプレート3に植え付ける。あるいは、プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、先ずプローブとプレートとの結合剤を局所的に付着させ、次に、結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付ける。こうして、プローブをプロットしたか所為が異の箇所に結合剤が付着していないバイオチップ20を製造する。

【選択図】 図1

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000233055

【住所又は居所】

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

【氏名又は名称】

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100091096

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】

100102576

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】

渡辺 敏章

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社